

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. med. L. Demling)

Mikrolipid-Elektrophoresen auf Celluloseacetat-Folien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

WALTER GRONAUER

aus Weilheim i. Obb.

D 29

1970



Dekan: Professor Dr. med. H. Valentin

Referent: Professor Dr. med. L. Demling

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1970

MIKROLIPIDELEKTROPHORESEN AUF CELLULOSEACETATFOLIEN

W. GRABNER, W. GRONAUER, G. BERG UND D. BERGNER

Medizinische Klinik mit Poliklinik der Universität Erlangen-Nürnberg* (Deutschland)

(Eingegangen am 12. Dezember, 1969)

SUMMARY

Lipoprotein Microzone Electrophoresis on Cellulose Acetate Strips

A method is described for analysis of lipoproteins using the microzone electrophoresis on cellulose acetate strips. The technique is simple, and shows excellent results. The whole procedure can be completed within 2.5 h. Only a small sample is necessary. Three bands containing lipoproteins are well separated. The strips can be made transparent. Clinical results are discussed.

EINLEITUNG

Die Differenzierung der Hyperlipidämien hat während der letzten Jahre eine zunehmende Bedeutung erlangt. Voraussetzung für die Beurteilung und Einordnung dieser Fettstoffwechselstörungen sind geeignete diagnostischen Kriterien. Neben der klinischen Symptomatik und der Anwendung quantitativer Serumanalysen verschiedener Lipidfraktionen ist die elektrophoretische Trennung der Lipoproteide im Serum zum unentbehrlichen Bestandteil differentialdiagnostischer Überlegungen geworden.

Die Trennung der Lipoproteide erfolgte bislang auf Papier. Bessere Ergebnisse wurden jedoch in Agarose-Gel¹⁻³ und auf Celluloseacetatfolien⁴⁻¹⁰ erzielt. Der Bedarf einer relativ grossen Serummenge und ein erheblicher Zeitaufwand waren jedoch für die routinemässige Anwendung dieser Verfahren von grossem Nachteil.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob sich die Vorteile der Mikrozonenelektrophorese auch für die Darstellung der Lipoproteide nutzen lassen.

MATERIAL UND METHODIK

Bei insgesamt 208 Versuchspersonen wurden Mikrolipidelektrophoresen auf Acetatfolien durchgeführt. 169 stoffwechselgesunde Probanden dienten der Ermittlung der Normalwerte. Die diagnostische Brauchbarkeit der Methode wurde bei 39 Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern geprüft. Das angewandte Verfahren

* Direktor: Professor Dr. L. Demling.

stellt eine nach Kohn modifizierte Technik⁷⁻⁹ auf Folienkleinformaten dar, nach der die klassischen Eiweiss- und die Lipoproteidfractionen des Serums in einem Arbeitsgang analysiert werden können. Die methodischen Details umfassen folgende Schritte:

(1) Trennung des Serums

Vor Beginn des eigentlichen Trennvorganges müssen die Celluloseacetatstreifen (Format: 57 mm × 145 mm; Hersteller: Membranfilter GmbH Göttingen) 1 Min lang in Barbitol-Natrium-Puffer (pH 8.6; Ionenstärke 0.075) gelegt, anschliessend zwischen Fliesspapierstreifen von überschüssiger Feuchtigkeit befreit und in die Trennkammer (Microzone Cell, Model R 101 von Beckman Instruments) überführt werden.

Zur Darstellung der Lipoproteide muss das Serum mit dem handelsüblichen Stempel (Hersteller: Beckman Instruments) für Mikroelektrophoresen dreifach aufgetragen werden. (Ein Gerät, das die erforderliche Serummenge bei einmaliger Auftragung deponiert, wird zur Zeit entwickelt.) Für die gleichzeitig durchgeführte Trennung der Serumeiweissfractionen, die zur Bestimmung der Lipoproteidmobilität dient, genügt die einfache Auftragung. Abb. 1 zeigt das Modell einer beschickten Folie.

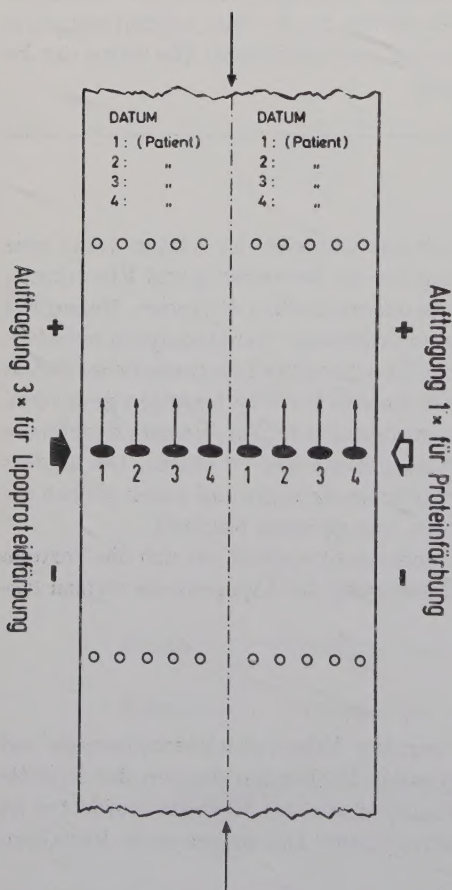


Abb. 1. Beschickte Membranfolie zur Darstellung der klassischen Serumeiweiss- und Lipoproteidfractionen.

Folgende Trennbedingungen, die in Einzelversuchen ermittelt wurden, erwiesen sich als zweckmässig:

Gleichspannung: 250 V

Stromstärke: 5 mA

Umgebungstemperatur: 20°–22°

Trennzeit: 25–30 Min

Nach der Trennung werden die Folien im Wärmeschrank bei 80° getrocknet und anschliessend in der Mitte durchtrennt, um Lipoprotein- und Proteinkomponenten jeweils spezifisch zu färben.

(2) Färbeverfahren

Die Anfärbung der bekannten Serumproteinfraktionen erfolgt mit Ponceau-Rot S, die der Lipoproteine mittels einer nach Kohn modifizierten Arbeitsweise^{4,9}. Um unspezifische Farbeffekte bei der Anfärbung der Fettkomponenten zu vermeiden, werden die Folien zunächst 15 Min lang mit Kunkels Lösung (1 g Phenol + 12 g NaCl ad 100 ml aqua dest.) getränkt. Diese Vorbehandlung eliminiert durch Denaturierung die bei dem Färbeprozess störenden Proteinanteile. Dadurch sind die einzelnen Lipoproteinbanden nach beendeter Färbung schärfer gegeneinander abgegrenzt. Der Flüssigkeitsüberschuss der Folien kann durch Einlegen derselben zwischen zwei Löschblätter, die fest aufeinander zu pressen sind, entfernt werden. Darauf lässt man die Streifen bei Zimmertemperatur vollständig trocknen. Das entstandene unregelmässige Folienrelief ist ohne Einfluss auf die Qualität der Anfärbung.

Die getrockneten Membranfolien werden in eine Glaskammer mit luftdicht schliessendem Deckel eingehängt. Die Grösse einer solchen Kammer sollte so bemessen sein, dass jeweils 12 halbierte Folien darin Platz finden. Auf den Boden des Glasbehälters wird ein kleines Becherglas mit wasserfreiem Bariumperoxid gestellt, auf das man mittels einer Pipette konzentrierte Schwefelsäure auftröpfelt. Danach muss die unter dem Abzug stehende Glaskammer sofort geschlossen werden. Bei diesem ursprünglich von Kohn angegebenen Verfahren werden von den Esterfettsäuren Aldehyde abgespalten, die sich mit Schiffs Reagenz anfärben lassen¹⁰.

Nach 15–20 Min werden die Folien der Glaskammer entnommen und 1 Min mit 0.01 N HCl gewaschen. Die nun folgende Färbung in Schiffschem Reagenz sollte mindestens für eine Zeitdauer von 15 Min erfolgen.

Schliesslich werden die Streifen jeweils für 5 Min in drei "Reduzierbädern" (Kaliummetabisulfit in 0.1 N HCl) gespült, bis ein nahezu farbloser Hintergrund erzielt ist⁹. Dann müssen die Folien nochmals 15 Min lang in 0.01 N HCl gewaschen werden. Die folgende Trocknung soll entweder bei Zimmertemperatur oder im Wärmeschrank bei 80° erfolgen.

(3) Transparenzverfahren

Um eine ausreichende Folientransparenz zu erhalten, werden die trockenen Streifen ca. 4 Min lang in ein Äthanolbad eingelegt. Nun müssen sie ebensolange einem Äthanol-Eisessig-Gemisch (3:1, v/v) ausgesetzt, darauf mit einer Hartgummischeibe blasenfrei auf eine Glasplatte aufgezogen und bei ca. 120° im Wärmeschrank wieder getrocknet werden.

Die densitometrische Auswertung der Protein- und Lipoproteinanfärbung kann mit dem Analytrol (Hersteller: Beckman Instruments) durchgeführt werden.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Lipoproteidfractionen unabhängig von der angewandten Methode durch zahlreiche Kriterien verändert sein können. Erinnert sei beispielsweise an Infektionskrankheiten, die bereits während der Inkubationszeit eine erhebliche Senkung der Lipoproteide bedingen können, an Stress-Situationen, insbesondere an Zustände nach frischem Koronarinfarkt, die häufig auch mit einer Abnahme der Serumlipide einhergehen¹ oder an die Anwendung hormonaler Kontrazeptiva sowie anderer Hormonpräparate, die nicht ohne Einfluss auf den Serumlipidspiegel sein dürften.

Zur Ausschaltung von Störfaktoren sollte die Blutentnahme unter folgenden Kautelen durchgeführt werden: (a) Blutentnahme morgens vor dem Aufstehen; (b) 12-stündige Nahrungskarenz und fettfreie Kost seit Mittag des Vortages; (c) keine vorausgehende stärkere körperliche Betätigung^{1,11}.

Für quantitative Aussagen sind gleichzeitig Parallelbestimmungen der Gesamtlipide, des Gesamtcholesterins, der Triglyceride und, wenn möglich, der freien Fettsäuren und Phospholipide erforderlich.

ERGEBNISSE

(1) Normalbefunde

Tabelle I zeigt sogenannte Normalverteilungen bei Stoffwechselgesunden. Gesamtlipide, Gesamtcholesterin und Triglyceride lagen bei diesem Personenkreis im Normalbereich. Die Altersgruppeneinteilung erfolgte in der von Böhle vorgeschlagenen Weise: 18–30, 31–45 und 46–60 Jahre¹. Die Interpretation der Lipoproteidverteilungen bei über 60-jährigen, die in einer weiteren Gruppe erfasst wurden, sollte nach Fredrickson *et al.*¹² insbesondere bei hohen Werten mit der notwendigen Kritik erfolgen.

Da bei der angewandten Mikrotechnik die von Böhle *et al.* angegebene Alters-einteilung nicht zweckmässig erscheint, wurde aus Gründen der klinischen Routineanwendung das Untersuchungsgut in zwei Altersgruppen unterteilt, wobei Geschlechtsunterschiede wegen der nur geringfügigen Differenzen vernachlässigt werden konnten. Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, nachdem eine Prüfung der in Tabelle I angegebenen Werte nach varianzanalytischen Gesichtspunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erbrachte.

Die Werte der genannten Tabellen stellen die Mittelwerte der Lipoproteidfractionen in relativen Prozenten dar. Die Ergebnisse der Tabelle II wurden nach

TABELLE I

DURCHSCHNITTSWERTE (%) DER LIPOPROTEIDFRAKTIONEN DES SERUMS UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON ALTER UND GESCHLECHT (MIKROZONEN-ELEKTROPHORESE AUF CELLULOSEACETATFOLIEN)

Geschlecht	Alter (Jahre)	n	α_1 -Lipoproteid	α_2 -Lipoproteid	β -Lipoproteid
♂	18–30	48	25.1	21.6	53.3
	31–45	19	23.4	19.3	57.2
	46–60	17	23.7	15.1	61.2
	>60	15	21.8	18.1	60.1
♀	18–30	37	28.4	14.4	57.2
	31–45	11	25.9	18.0	56.0
	46–60	9	18.9	16.9	64.2
	>60	13	18.5	18.2	63.4

TABELLE II

DURCHSCHNITTSWERTE (%) DER LIPOPROTEIDFRAKTIONEN DES SERUMS BEI STOFFWECHSEL-
GESUNDEN PROBANDEN

n	Alter (Jahre)	α_1 -Lipoprotein		α_2 -Lipoprotein		β -Lipoprotein		$Q = \frac{\beta\text{-Lipoprotein}}{\alpha_2\text{-Lipoprotein}}$
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
141	18-60	25.2	6.7	18.0	7.3	56.7	8.5	3.2
28	>60	20.3	7.9	18.1	9.6	61.6	11.0	3.4

dem Erweis ihrer Normalverteilung mit Hilfe des *t*-Testes statistisch geprüft. Gesicherte Unterschiede sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Das angewandte Verfahren ermöglicht die Darstellung von mindestens 3 Lipoproteidfraktionen, die nach immunologischen Gesichtspunkten als α_1 -Lipoprotein, α_2 -Lipoprotein und β -Lipoprotein bezeichnet werden. Die α_1 -Lipoproteidfraktion enthält reichlich Phospholipoid^{1,13}, während der Triglyceridanteil gering ist. Ihr Wanderungsmaximum liegt meist zwischen Albumin- und α_1 -Globulinbereich¹. Nach Berg¹³ sind in der α_1 -Lipoproteidbande zwei immunologisch nachweisbare Komponenten enthalten, die jedoch mit der Mikrolipidelektrophorese bei dem geringen Serumbedarf von 0.75 μ l nicht differenziert werden können.

Die α_2 -Lipoproteide enthalten vorwiegend Triglyceride. Deshalb kommt ihnen eine besondere differentialdiagnostische Bedeutung bei endogenen Hypertriglyceridämien zu^{11,14}. Die Mobilität dieser Fraktion, die von einigen Autoren^{2,12,14-16} auch als Prae- β -Lipoprotein bezeichnet wird, entspricht weitgehend der der α_2 -Globuline. Gelegentlich wird dieser Bereich auch zu den β -Lipoproteiden gezählt¹.

Die β -Lipoproteidfraktion enthält vorwiegend Cholesterin. Daraus resultiert ihr diagnostischer Wert bei Hypercholesterinämien^{11,12,14}. Sie wandert mit dem Transferrin, der Hauptkomponente der β -Globuline. Im Pherogramm stoffwechselgesunder Individuen stellen die β -Lipoproteide die stärkste Fraktion dar^{1,11}.

Wie aus den Tabellen I und II hervorgeht, verschieben sich mit zunehmendem Alter die Relationen der Serumlipoproteide von der schnellwandernden α_1 -Lipoproteidfraktion in den Bereich der β -Bande¹⁷. Die relativen Anteile der α_2 - und β -Lipoproteide lassen in Form des Quotienten $Q = \beta\text{-Lipoprotein}/\alpha_2\text{-Lipoprotein}$ Aussagen über

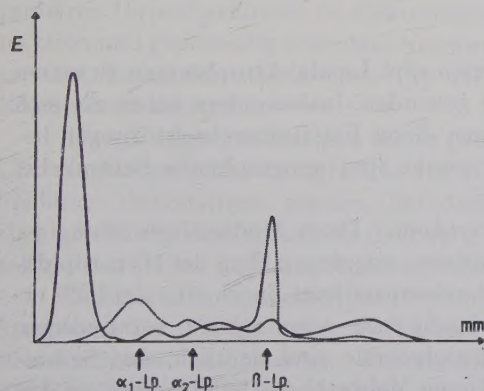


Abb. 2. Mikrozonenelektropherogramm bei einem stoffwechselgesunden 32-jährigen Probanden. —, Proteinfärbung; ·····, Lipoproteinfärbung.

Zu- bzw. Abnahmen der in den entsprechenden Fraktionen enthaltenen Triglycerid- und Cholesterinmengen zu¹¹.

In Abb. 2 soll das Pherogramm einer Mikrolipidelektrophorese bei einem stoffwechselgesunden jungen Mann gezeigt werden.

Den Nachweis der Reproduzierbarkeit in der Reihe der mit Mikrolipidelektrophoresen gefundenen Werte lieferte die 15-fache Auftrennung eines pathologischen Serums: Die Streuung der Einzelwerte erfüllte statistisch alle Bedingungen einer Normalverteilung. Die Berechnung des Variationskoeffizienten ergab für die einzelnen Fraktionen folgende Werte: α_1 -Lipoproteid, 7.4%; α_2 -Lipoproteid, 6.2%; β -Lipoproteid, 14.8%. Der Variationskoeffizient der β -Fraktion erfordert die Durchführung von Doppelbestimmungen.

Abb. 3 zeigt einen Ausschnitt der Trennungen des untersuchten Serums.

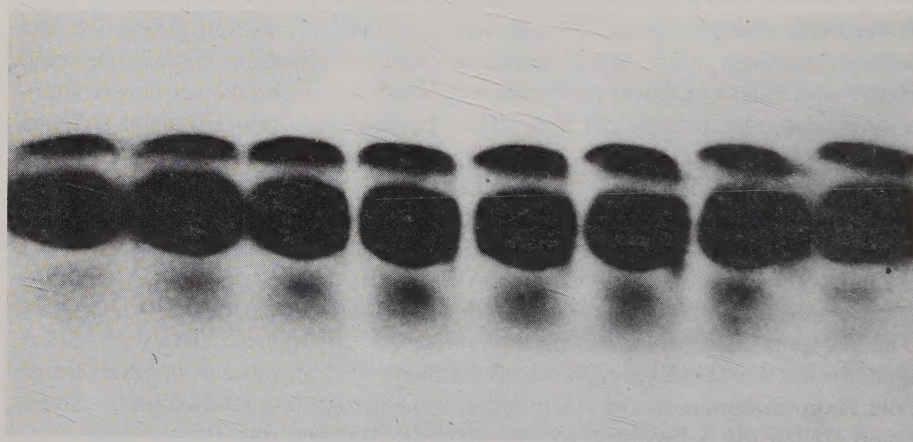


Abb. 3. Darstellung der Lipoproteidfraktionen eines getrübbten Serums. Trennzeit: 25 Min. 3-fache Vergrößerung.

(2) Pathologische Befunde

Anhand verschiedener Krankheitsbilder sollte die Brauchbarkeit der Methode für diagnostische Zwecke geprüft werden.

(a) Hyperlipidämien

Für die Beurteilung der Hyperlipidämien sind Lipidelektrophoresen zu einem unentbehrlichen diagnostischen Bestandteil geworden. Insbesondere haben sie sich bei der Klassifizierung der essentiellen Formen dieser Fettstoffwechselstörungen bewährt^{2,3,12,14,16}. Als Beispiele sollen einige typische lipopherographische Befunde bei folgenden Krankheitsbildern gezeigt werden:

Kohlenhydratinduzierbare Hypertriglyceridämie. Diese Stoffwechselstörung ist dem Typ IV nach Fredrickson *et al.*¹² zuzuordnen, was dem 2. Typ der Hyperlipidämien nach Kahlke *et al.*¹⁴ entspricht. Sie ist gekennzeichnet durch eine deutlich erhöhte α_2 (Prae- β)-Lipoproteidfraktion, die häufig mit einer relativ verminderten β -Lipoproteidbande einhergeht. Die Serumtriglyceride sind deutlich, das Serumcholesterin oft, jedoch nicht immer erhöht. In der Mehrzahl der Fälle konnte bei den untersuchten Patienten eine pathologische Glukosetoleranz nachgewiesen werden. In Abb. 4 ist ein typisches Pherogramm dieser Fettstoffwechselanomalie dargestellt.

Hypercholesterinämie. 4 Patienten mit ausgeprägter Hypercholesterinämie (Gesamtcholesterol bis über 600 mg/100 ml) liessen die typischen Kriterien der erhöhten β -Lipoproteinfraktion bei relativ verminderten α -Lipoproteiden erkennen. Diese Hyperlipidämieform entspricht dem Typ II nach Fredrickson *et al.* bzw. dem 4. Typ nach Kahlke *et al.*^{2,3,12,14,16}. Abb. 5 zeigt ein Beispiel.

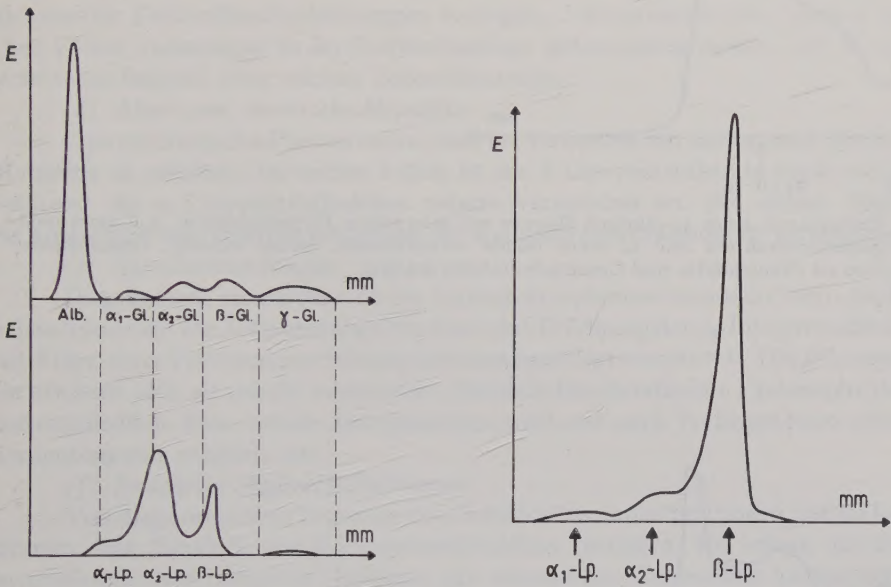


Abb. 4. Lipoproteiddarstellung bei einem 30-jährigen adipösen Patienten mit KH-induzierbarer Hypertriglyceridämie nach 3-tägiger isokalorischer Kost. Serum getrübt; Triglyceride: 610 mg/100 ml; Gesamtcholesterin: 276 mg/100 ml; Gesamtlipide: 1540 mg/100 ml. Oben: Proteinfractionen. Unten: Lipoproteidfractionen.

Abb. 5: Erhöhte Lipoproteidfraction bei Hypercholesterolämie.

Hypercholesterinämie mit Hypertriglyceridämie. Diese Kombinationsform der primären Hyperlipidämien ist elektrophoretisch durch Erhöhung der β -Lipoproteinfraktion und gleichzeitig über dem Normwert liegender α_2 -Lipoproteinbande charakterisiert. Es handelt sich um den Typ III nach Fredrickson, was dem 5. Typ nach Kahlke *et al.* entspricht^{2,12,14,16}.

Da ein typisches Beispiel dieser primären Hyperlipidämie zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht vorlag, soll in Abb. 6 das Pherogramm einer sekundären Hyperlipidämie demonstriert werden. Bei diesen Fettstoffwechselstörungen findet sich ebenfalls häufig eine simultane Erhöhung der Cholesterin- und Triglyceridwerte. In zahlreichen Fällen liegt eine Alkoholgenese zugrunde.

Bei fast allen untersuchten Hyperlipidämiefällen fanden sich als hinweisende Symptome für den gestörten Stoffwechsel atherosklerotische Gefässveränderungen, stenokardische Beschwerden, Myokardinfarkte, arterielle Verschlusskrankheiten, Kohlenhydratstoffwechselstörungen (path. Glukose-Toleranz-Test), Leberepithelverfettungen, gelegentlich auch kolikartige Oberbauchschmerzen, Varikosis, Xanthome und Xanthelasma^{11,12,14,16}.

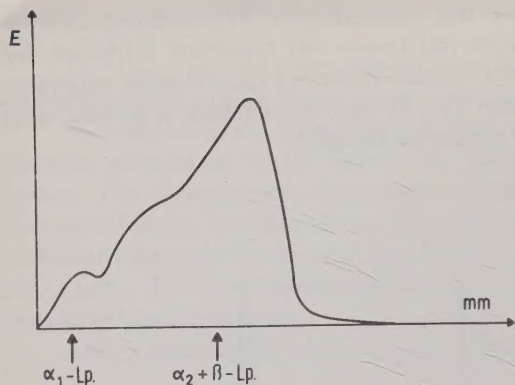


Abb. 6. Pherogramm eines 33-jährigen Mannes mit sekundärer Hyperlipidämie. α_2 -Lipoprotein- und β -Lipoproteinfraktion sind zu einer Bande verschmolzen. Serum milchig; Gesamtlipide: 7380 mg/100 ml (Neutralfette und Gesamtcholesterin erhöht).

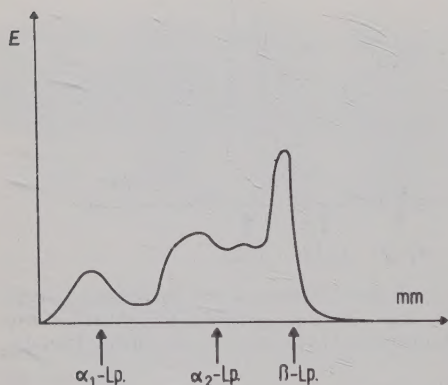


Abb. 7. Lipopherogramm bei Leberepithelverfettung. Doppelgipfelige α_2 -Lipoproteinfraktion.

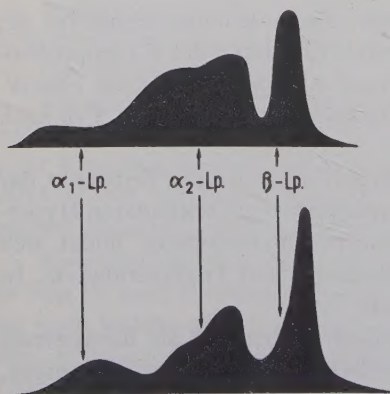


Abb. 8. Oben: Lipopherogramm eines 36-jährigen Patienten mit Hyperlipämie und asymptomatischem Diabetes mellitus. Gesamtcholesterin: 302 mg/100 ml; Gesamtlipide: 1355 mg/100 ml; α_2 -Lipoprotein: 62 rel.-%; β -Lipoprotein: 24.1 rel.-%. Unten: Befundbesserung durch diätetische Massnahmen. α_2 -Lipoprotein: 45.9 rel.-%; β -Lipoprotein: 41.9 rel.-%.

(b) Leberepithelverfettung

Bei Leberepithelverfettungen fanden sich in der Regel als Ausdruck des gestörten Fett-Transportes relativ hohe α_2 -Lipoproteide bei gleichzeitig verminderter β -Lipoproteidbande. Die Triglyceride sind dementsprechend vermehrt^{8,10}.

(c) Diabetes mellitus

Lipidelektrophoresen bei Diabetikern sind besonders dann von Interesse, wenn gleichzeitig Fettstoffwechselstörungen vorliegen. Verlaufskontrollen können in solchen Fällen Änderungen in der Stoffwechsellage differenzieren helfen. Abb. 8 demonstriert das Beispiel einer solchen Befundkontrolle.

(d) Akute und chronische Hepatitis

Charakteristische Pherogramme sind bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis zu erhalten. In beiden Fällen ist die β -Lipoproteidbande stark vermehrt, während die α_2 -Lipoproteidfraction relativ vermindert ist. Bei akuter Hepatitis ist ausserdem eine relative Abnahme der α_1 -Lipoproteidfraction zu verzeichnen^{10,17}.

(e) Nierenerkrankungen

Diagnostisch verwertbar ist die Lipidelektrophorese besonders beim nephrotischen Syndrom. Die Literaturangaben über eine Erhöhung der α_2 -Lipoproteidfraction als Folge einer Fetttransportstörung konnten bestätigt werden^{10,17}. Die β -Lipoproteide erwiesen sich als relativ vermindert. Befunde bei chronischer Pyelonephritis sind unterschiedlich. Eine sichere Interpretation wird erst nach Vorliegen eines grösseren Patientengutes möglich sein.

(f) Endokrine Stoffwechselstörungen

Von diagnostischem Interesse sind Schiiddrüsenunterfunktionen, die im Lipidogramm eine Zunahme der β -Lipoproteidfraction bedingen. Bei einem 42-jährigen strumektomierten, adipösen Patienten mit chronischer Thyreoiditis fanden sich z.B. die β -Lipoproteide um mehr als 10 rel.-% vermehrt, während die α_1 -Lipoproteidfraction

TABELLE III

LIPOPROTEIDMUSTER BEI VERSCHIEDENEN KRANKHEITSBILDERN

Diagnose	n	Lipoproteidfraction			
		α_1	α_2	β	$Q = \beta/\alpha_2$
Kohlenhydratinduzierbare Hypertriglyceridämie	14	10.0	49.9	40.0	0.8
	I	8.6			
	2*	11.5	52.1	36.4	0.7
	I**	10.6	42.6	46.8	1.1
Hypercholesterinämie	2	13.2	16.1	70.8	4.4
	I*	10.7	23.2	66.1	2.9
	I**	7.4	8.8	83.8	9.5
Leberepithelverfettung	5	11.1	53.7	35.2	0.7
	I*	23.9	42.0	34.1	0.8
Latenter + asymptomatischer Diabetes mellitus	4	9.7	40.7	49.7	1.2
	I*	8.8	35.3	55.9	1.6
Hepatitis, akute und chronische	I	11.8	5.9	82.4	14.0
	I	20.0	7.5	72.5	9.7
Nierenerkrankungen	3	19.8	44.3	35.8	0.8
Chronische Thyreoiditis	I	10.3	19.0	70.7	3.7

* Patient unter 30 Jahre.

** Patient über 60 Jahre.

tion um etwa denselben Betrag verringert war (Gesamtcholesterin: 644 mg/100 ml; Gesamtlipide: 1673 mg/100 ml; Triglyceride: 329 mg/100 ml).

In Tab. III sind die pathologischen Befunde zusammenfassend dargestellt. Statistisch gesicherte Grössen sind kursiv gedruckt.

DISKUSSION

Fast alle bislang gebrauchten Trägermaterialien erforderten die Anwendung von Makrotechniken^{1-3,7,10,15}. Deshalb erschienen die Warnungen vor Ungenauigkeiten der Mikromethode durchaus gerechtfertigt^{5,10}. Die guten Erfahrungen mit Makroli-pidelektrophoresen auf Celluloseacetatfolien^{7,8,10} berechtigten jedoch zu dem Versuch, das Trägermaterial auch für die Mikrotechnik zu testen. Dabei ergaben sich wesentliche Vorteile für die Routineanwendung.

Eine Vorbehandlung des Serums für die Trennung ist unnötig. Der minimale Serumbedarf von 0.75 μ l gestattet auch die Aufarbeitung sehr geringer Restmengen, was im Vergleich zur Makromethode mit relativ hohem Serumbedarf günstig ist. Die Vorbehandlung der gebrauchsfertigen Folien, das Auftrageverfahren und der Trennvorgang sind technisch einfach und gerade deshalb für routinemässige Laboruntersuchungen geeignet. Die Trennzeiten sind ausserordentlich kurz^{3,7}, der Kostenaufwand geringer als bei der Agarose-Gel-Elektrophorese. Das angegebene Färbeverfahren besticht durch seine hohe Farbintensität. Vergleichende eigene Untersuchungen mit anderen Färbemethoden, z.B. Oil Red O^{1,15}, brachten für die Mikrozonenelektrophorese keine ähnlich guten Ergebnisse.

Bei Anwendung der Färbemethode nach Kohn⁹ erschweren gelegentlich unspezifische Farbeffekte^{7,8,10} die Auswertung der Pherogramme. Zur Vermeidung dieses Phänomens wurden in einer nach Scheidegger modifizierten Weise die Celluloseacetatstreifen vor dem eigentlichen Färbeprozess für 15 Min mit Kunkels Lösung getränkt. Das Verfahren ermöglicht die Darstellung mindestens dreier, klar abgesetzter Lipoproteidbanden. Die Eiweissadsorption ist bei dem benutzten Material gering¹⁰. Hervorzuheben ist ferner die grosse Haltbarkeit der Membranfolien. Weiterhin von Vorteil sind der nahezu farblose Hintergrund und die gute Transparenz. Das Transparenzverfahren ist zudem zeitsparend und für die photometrische Auswertung gut geeignet.

Im Vergleich zur Makrotechnik auf Acetatfolien^{7,8,10} darf die angewandte Mikromethode als rationell bezeichnet werden. In der Beckman-Kammer können in 25 Min 8 Seren, in der Boskamp-Kammer 24 Seren gleichzeitig getrennt werden. Bereits 150 Min nach Auftragen des Serums stehen die Ergebnisse für die klinische Diagnostik zur Verfügung. Die Vorteile dieses Mikroverfahrens erleichtern ausserdem die Durchführung von Doppel- und Dreifachbestimmungen, was die Genauigkeit der Methode verbessert. Protein- wie Lipoproteidpherogramme können mit dem gleichen Gerät (Analytrol, Hersteller: Beckman Instruments) photometrisch ausgewertet werden. Die Mikrozonentechnik hat sich auch für die immunologische Darstellung von Proteinen und Lipoproteiden als geeignet erwiesen¹⁸.

Kritisch zu beurteilen ist bei dem beschriebenen Verfahren die α_1 -Fraktion. Eine offenbar unspezifische Albuminanfärbung findet sich häufig vor dem eigentlichen α_1 -Lipoproteid, das zwischen der Albumin- und der α_1 -Globulinfraktion wandert. Dieser "Trübungseffekt" lässt sich zwar in der Regel gut vom α_1 -Lipoproteid abgrenzen.

zen, gelegentlich jedoch kommt es zu einer Verschmelzung mit der genannten Fraktion, so dass sich bei der photometrischen Darstellung ein Plateau ergibt. Unter Verwendung von Kunkels Lösung können unspezifische Trübung und spezifische Farbbande meist besser gegeneinander abgegrenzt werden. Da der "Trübungseffekt" offensichtlich methodisch bedingt ist, wurde er nicht in die Auswertung mit einbezogen (siehe die Darstellung des unspezifischen Trübungseffektes in Abb. 9). Die immunoelektrophoretisch gesicherten Unterfraktionen der α_1 -Lipoproteide¹³, die auch mit Hilfe des Makroverfahrens auf Folien in manchen Fällen als darstellbar beschrieben wurden^{7,10}, lassen sich mit der angegebenen Mikromethode nicht differenzieren. Im γ -Bereich konnte gelegentlich eine sehr schwache Lipoproteidfärbung beobachtet werden^{1,17}. Sie kann sowohl in Form einer "Schleppe" als auch in Form einer Gauss-Verteilung zur Darstellung kommen. In vielen Fällen ist sie jedoch nicht nachweisbar⁷. Ihre Abnahme nach Vorbehandlung der Folie mit Kunkels Lösung spricht für ihre leichte Denaturierbarkeit. Auf eine Einbeziehung dieses Bereiches in die Auswertung wurde verzichtet. Ob ein Zusammenhang mit der Chylomikronenfraktion der Agarose-Gel-Elektrophorese^{3,14} besteht, liess sich mit der angegebenen Mikromethode auf Membranfolien bei dem bislang untersuchten Patientenmaterial noch nicht nachweisen. Das mag vielleicht daran liegen, dass noch kein geeignetes Serum eines Patienten mit der seltenen Form einer fettinduzierbaren Hypertriglyceridämie^{12,14} zur Verfügung stand. Eine zusammenfassende Illustration aller oben genannten Faktoren möge Abb. 9 vermitteln.

Der Untergrund mit Schiffs Reagenz gefärbter Folien wird in je 3 "Reduzierbädern" mit 3-%iger wässriger HNO_3 in kürzester Zeit entfärbt⁹. Dies vermindert aber bei den geringen Serummengen der Mikrozonenelektrophorese die Farbtintensität der Banden. Unter Verwendung einer "Reduzierlösung" von Kaliummetabisulfit in 0.1 N HCl ⁹ wurden die besten Ergebnisse erzielt. Das Färbeverfahren bringt sicher einige Fehlerquellen mit sich, die aber im Vergleich zu anderen Methoden nicht überbewertet werden sollten; denn die erzielten Ergebnisse rechtfertigen den Vergleich mit anderen Verfahren.

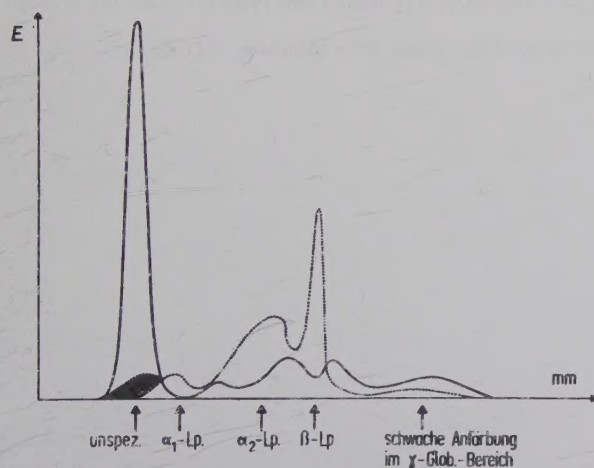


Abb. 9. —, Proteinfärbung; ·····, Lipoproteidfärbung.

Der Nachteil einer dreifachen Auftragung dürfte durch Konstruktion eines neuen Spezialstempels leicht zu beheben sein. Unangenehm ist ferner das Arbeiten mit Phenol (Kunkels Lösung) und Eisessig (Transparenzbad) sowie das Auftreten von SO_2 im Entfärbebad. Wegen der Gas- und Rauchentwicklung sollte das Verfahren nur in gut durchlüfteten Räumen angewandt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren zur elektrophoretischen Darstellung der Lipoproteide mit Hilfe der Mikrozonenelektrophorese beschrieben.

Die Methode ist technisch einfach. Sie zeichnet sich aus durch gute Trennergebnisse bei minimalem Serumbedarf, geringen Zeit- und Kostenaufwand sowie hoher Farbtintensität der Banden. Mindestens 3 lipidhaltige Fraktionen kommen zur Darstellung. Über die klinische Anwendbarkeit bei Fett- und Kohlenhydratstoffwechselstörungen sowie anderen Krankheitsbildern wird berichtet.

LITERATUR

- 1 A. DITTMER, *Plasmaeiweiss und Elektrophorese*, Fischer Verlag, Jena, 1965.
 - 2 R. P. NOBLE, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 693.
 - 3 W. RAPP UND W. KAHLKE, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 493.
 - 4 J. KOHN, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 297.
 - 5 J. KOHN, *Ärztl. Lab.*, 10 (1964) 233.
 - 6 K. H. MAIER UND K. VOGGEL, *Z. Anal. Chem.*, 186 (1962) 257.
 - 7 G. BERG UND P. RUDOLPH, *Med. Welt*, 17 (1966) 193.
 - 8 G. BERG UND G. H. WILLITHAL, *Klin. Wochschr.*, 43 (1965) 1109.
 - 9 J. KOHN, *Nature*, 189 (1961) 316.
 - 10 G. BERG UND TH. PASCH, *Fortschr. Med.*, 85 (1967) 363.
 - 11 F. KNÜCHEL, *Med. Welt*, 18 (N.F.) (1967) 1818.
 - 12 D. S. FREDRICKSON, R. J. LEWY UND R. S. LEES, *New Engl. J. Med.*, 276 (1967).
 - 13 G. BERG, *Deut. Ges. Inn. Med.*, 70 (1964) 971.
 - 14 W. KAHLKE, G. SCHETTLER UND G. SCHLIERF, *Deut. Med. J.*, 8 (1968) 258.
 - 15 H. P. CHIN UND D. H. BLANKENHORN, *Clin. Chim. Acta*, 20 (1968) 305.
 - 16 C. PRIES, C. M. VAN GENT, H. BAES, M. K. POLANO, H. A. M. HULSMAN UND A. QUERIDO, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 181.
 - 17 SCHEIFFARTH, BERG UND GÖTZ, *Papierelektrophorese in Klinik und Praxis*, Urban und Schwarzenberg, München-Berlin, 1962.
 - 18 W. GRABNER, E. MORHARD UND G. BERG, *Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6 (1968) 478.
- Clin. Chim. Acta*. 28 (1970) 299-310

LEBENS LAUF

Am 7. Januar 1943 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Max Gronauer und dessen Ehefrau Anna Gronauer in Weilheim/Obb. geboren.

Nach dem Besuch der dortigen Volksschule vom September 1949 bis Juli 1953 trat ich am 3. September 1953 in die Oberrealschule Weilheim/Obb. ein. Vom September 1954 bis Juli 1957 besuchte ich die Oberrealschule Landsberg/Lech und verbrachte die folgenden Jahre bis zum Abitur im Juni 1963 wieder an der Oberrealschule Weilheim/Obb.

Nach meiner Immatrikulation am 6. November 1963 studierte ich an der Universität Erlangen Medizin. Im Wintersemester 1965/66 setzte ich mein Studium an der Universität München fort. Seit dem Sommersemester 1966 studierte ich wieder an der Universität Erlangen, wo ich am 4. Februar 1970 die ärztliche Prüfung abgelegt habe.

